

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração Implantodontia

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO QUANTITATIVO DE OSTEÓBLASTOS
SOBRE DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES**

Dissertação de Mestrado

Maria Angélica Rehder de Araujo

**Florianópolis
2006**

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração Implantodontia

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO QUANTITATIVO DE OSTEÓBLASTOS
SOBRE DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia –Área de concentração Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
(adjunto), lotado no Departamento de Estomatologia, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Co-orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.,
lotado no Departamento de Estomatologia, da Universidade de São Paulo.

Florianópolis - 2006

Ficha Catalográfica

Catálogo na fonte por: Vera Ingrid Hobold Sovernigo CRB-14/009

A663a Araujo, Maria Angélica Rehder de.

Avaliação do crescimento quantitativo de osteoblastos sobre diferentes tipos de superfícies / Maria Angélica Rehder de Araujo ; orientador Ricardo de Souza Magini. - Florianópolis, 2006.
f.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia
- Opção Implantodontia.

Inclui bibliografia.

1. Osteoblastos. 2. Células. 3. Implantes dentários. 4. Superfície - tratamento. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-089.843

Maria Angélica Rehder de Araújo

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO QUANTITATIVO DE OSTEÓBLASTOS SOBRE DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de “Mestre em Odontologia”, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Florianópolis, 08 de fevereiro de 2006

Prof.Dr. Ricardo de Sousa Vieira
-Coordenador do Programa-

BANCA EXAMINADORA:

Prof.Dr. Ricardo de Souza Magini
-Orientador-

Prof.Dr. Décio dos Santos Pinto Junior
Coorientador

Prof.Dr. Ney Soares de Araujo
-Membro-

Dedico este trabalho

Aos grandes amores da minha vida **Carlos** e aos meus filhos, **Paulo** e **Andréa**, que me apoiaram e acreditaram neste projeto, “muitas vezes” mais do que eu mesma, sem vocês eu não teria chegado aqui.

A*gradecimentos*

*A **Deus**, por ser a razão de tudo.*

*Ao meu amor, **Carlos**, por ser o responsável pela formação e evolução da minha carreira científica. Obrigada pelo apoio e pela sustentação deste projeto, sem o seu otimismo e perseverança eu realmente não teria chegado ao fim desta jornada.*

*Aos meus filhos **Paulo** e **Andréa**, por serem a força necessária para eu superar as adversidades e ir à busca dos meus sonhos. Agradeço pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus pais, **Acyr** e **Herminia**, por serem o alicerce de toda esta construção. Obrigada por tudo.*

*Aos meus sogros **Paulo** e **Lucia**, por serem minha segunda família, por serem essenciais na concretização desta construção. Obrigada pelo carinho e pela força indispensáveis nesta caminhada.*

*Ao meu professor e orientador, **Ricardo de Souza Magini**, por me ensinar a sonhar, a acreditar e a buscar.*

*Ao professor **Antônio Carlos Cardoso**, por despertar em mim o senso crítico.*

*Aos amigos-irmãos, **Aline, César, Cleide**, força, compreensão, coragem, paciência, serenidade, um constante aprendizado. Sem vocês teria sido impossível superar a ausência da minha família.*

*Aos amigos do mestrado e doutorado, **César, Raul, Magal, Cleide, Aline, Dirce, Cimara, Titi, Gustavo e Hiron**, pelo companheirismo, tornando a jornada menos árdua.*

*Aos estagiários, **China, Marcel e Iza**, pelo companheirismo e colaboração imprescindível.*

*Às funcionárias do CEPID, **Dolores, Gisela, Miriam e Taís**, pela dedicação, paciência e companheirismo.*

*À funcionária da Pós-graduação, **Ana**, pela dedicação em sua função.*

*Aos **funcionários da faculdade**, pela dedicação e colaboração em todos os momentos.*

Araújo, Maria Angélica Rehder de. **Avaliação do crescimento quantitativo de osteoblastos sobre diferentes tipos de superfícies**. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Implantodontia) – Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento quantitativo de linhagens celulares osteoblásticas oriundas da calvária de rato sobre 3 diferentes superfícies de implantes testando uma metodologia inédita de cultura de células diretamente sobre a superfícies dos implantes : Grupo I, implantes usinados, Grupo II, implantes com textura produzida por ataque ácido e Grupo III, implantes especialmente produzidos para este estudo com superfície jateada por partículas seguida de banhos ácidos. Os implantes (n=27) foram imobilizados através de um dispositivo especialmente criado, cultivadas com 1×10^4 células, tripsinizados e submetidos a contagem na câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 h. A análise estatística demonstrou não existirem diferenças entre os tipos de implantes com relação ao número de células e o tempo. Os resultados permitem concluir que a superfície proposta neste estudo, grupo III, apresentou comportamento semelhante ao das outras duas tradicionalmente utilizadas, grupos I e II e sugere sua utilização sem riscos. A metodologia tornou possível a contagem do numero de células aderidas diretamente sobre os implantes com micro e macro topografias, aproximando a situação da realidade clinica.

Unitermos: implantes, cultura celular, osteoblastos, tratamento de superfície.

Araújo, Maria Angélica Rehder de. **Avaliação do crescimento quantitativo de osteoblastos sobre diferentes tipos de superfícies**. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Implantodontia) – Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Traduzir texto para inglês

ABSTRACT

The purpose of the current study was to investigate the growth of osteoblastic cells, obtained from rat calvarias, seeding on the three titanium implant surfaces testing an inedit culture methodology that allows cell growth directly onto these real following implant surfaces: group I: machined implants, group II: acid etch texture implants, group III: implants with a surface specially created for this study, particle blasted followed by a succession of acid bathes. The implants (n= 27) were immobilized with a specially created device, sed with 1×10^4 cells, tripsinized and submitted to counting procedure in a Neubauer camera after 24, 48 and 72 hours. The three surfaces evaluated in this study did not present statistical differences concerning cell adhesion and cell proliferation along 24, 48, and 72 h time intervals. The experimental surface, group III, blasted first and then, etched, behaved at least similarly to the traditional commercial surfaces, suggesting its utilization without risk. The methodology turned possible the cellular counting (cc) directly onto the real implant macro and micro topography, approximating the situation from clinical reality.

Keywords: dental implants, titanium, cell culture, surface treatment

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
INTRODUÇÃO	11
ARTIGO – Versão em português do artigo	17
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	43

INTRODUÇÃO

Os implantes endósseos são aceitos como modalidade de tratamento para reconstrução oral e craniofacial, servindo como estruturas transmucosas para suportar dentes unitários, parciais fixas, reconstruções de arcos edêntulos ou para reconstruções de defeitos maxilofaciais¹. A tecnologia dos implantes está continuamente envolvida com novos estudos que possam resultar em uma melhor compreensão dos princípios biológicos que regem o desenvolvimento da dinâmica interface entre o leito tecidual e uma estrutura artificial².

O sucesso da osseointegração de um implante está diretamente relacionado à formação óssea inicial e íntimo contato da superfície do implante com o tecido circunjacente², assim como o recrutamento de células inflamatórias para o local, agregamento de células pré-osteoblásticas e mesenquimais indiferenciadas e o comportamento destas em resposta as características da superfície.³⁻¹³

Entretanto os dados encontrados na literatura sobre os efeitos biológicos das propriedades das superfícies sobre a taxa de proliferação e diferenciação dos osteoblastos são contraditórios e não é clara a indicação de uma eficácia superior dada a uma superfície quando comparada a outras com diferentes propriedades. A diferenciação que resulta em um fenótipo osteoblástico é um processo de múltiplos passos regulado por diversos fatores, tais como hormônios e fatores de crescimento ou o mecanismo de apoptose¹⁴⁻¹⁶. A identificação da relação de atuação de um ou mais destes fatores sobre a proliferação e diferenciação celular frente as diferentes superfícies de implante ajudarão elucidar os fenômenos iniciais que levam a osseointegração e dirigir o desempenho clínico dos implantes. A condução de trabalhos *in vitro* com cultura de células e *in vivo*

poderão levar a uma melhor compreensão destes mecanismos e a sua relação com as propriedades das diferentes superfícies.

O exato efeito do titânio sobre os osteoblastos até agora é desconhecido e necessita mais estudos, e está diretamente relacionada ao condicionamento da superfície seja pela adsorção das proteínas, íons, açúcares presentes no sangue assim como as propriedades de topografia, química, energia de superfície e molhabilidade¹⁷.

Modificações na camada superficial de oxido de titânio tem sido sugeridos para aumentar o contato osso-implante a fim de aumentar a estabilidade secundaria e minimizar o tempo de osseointegração possibilitando resultados clínicos promissores em osso do tipo III e IV assim como em áreas enxertadas¹⁵. Uma superfície de titânio pode ser química ou fisicamente modificada através de técnicas de subtração ou adição de partículas a esta superfície promovendo o aparecimento de poros. Os poros da superfície promovem o espaço e o volume à migração celular garantindo o contato para a promoção da osteogênese a partir destas células. No caso de implantes lisos, não há a promoção desta colonização de células osteogênicas na superfície e a osseointegração procederá a partir das novas paredes criadas pela osteotomia^{10,17}. Diferentes tratamentos são usados para modificar a superfície do titânio²¹: coberturas com hidroxiapatitas, precedidas ou não por ataque acido, são usadas para criar rugosidades potencialmente bioativas²¹, jateamento de partículas, óxidos, com ou sem ataque acido^{21,22} são usadas para desenvolver superfícies rugosas, o método de oxidação anódina tem sido sugerido para formar poros e dar uma leve rugosidade à superfície de oxido de titânio podendo incluir a aplicação de diferentes eletrólitos contendo Ca e P e um adicional tratamento hidrotérmico, ou oxidação termal²³ podendo induzir o aparecimento de cristais de

hidroxiapatita, conferindo a superfície características osteoindutoras. O tratamento ácido foi o primeiro método de subtração utilizado e pode ser obtido utilizando-se uma mistura de ácido hidrocloreídrico e ácido sulfúrico ($\text{HCl} / \text{H}_2\text{SO}_4$) ou uma solução ácida de 2% de ácido clorídrico/ 10% ácido nítrico (HF/HNO_3)^{16,21}. Porém a técnica mais comum de subtração é o jateamento de partículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) sob pressão controlada. Mais recentemente surgiu no mercado um novo tipo de tratamento que tem apresentado melhores resultados por agregar as vantagens do jateamento e do ataque ácido, produzindo macroretenções (250 a 500 μm) a custo do jateamento e microretenções pela ação do ácido (2,0 μm)¹⁷.

Segundo PIATELLI et al¹⁶ o procedimento de ataque ácido com 1% de ácido hidrófluorídrico / 30% de ácido nítrico após o jateamento eliminou as partículas de alumina residual. A taxa de rugosidade superficial (R_a) produzidas pelo jateamento e ataque ácido as superfícies foi de 2.15 μm . Os testes de toxicidade mostraram que o jateamento e o ataque ácido a superfície dos implantes não produziram um efeito tóxico a células e parecem ser biocompatíveis. Os osteoblastos que aderiram aos implantes usinados apresentaram uma configuração mais plana, enquanto as mesmas células que aderiram à superfície tratada com jato e ataque ácido mostraram-se com uma morfologia irregular e muitos lamilipódios. Esta morfologia irregular pode melhorar a ancoragem inicial das células, promovendo uma melhor osseointegração aos implantes com tratamento de superfície de jateamento e ataque ácido¹⁶. O processo de jateamento pode ser realizado usando partículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) de granulação média ou grande¹⁸⁻²¹. Um aumento significativo ao torque de remoção tem sido demonstrado para

os implantes com este tipo de tratamento assim como uma menor perda óssea antes e depois dos implantes serem submetidos à carga^{18, 21}.

Não existe ainda um consenso do melhor tratamento de superfície para se obter uma maior taxa de tecido mineralizado perto da interface e para otimizar o sucesso clínico. Assim, tem sido sugerida uma rugosidade de 1,5 μm que em tese produz uma maior resposta óssea tanto para superfícies usinadas como para superfícies rugosas²¹.

Um maior contato ósseo inicial é reportado para superfícies com duplo ataque ácido térmico e isto tem sido atribuído à fixação inicial da fibrina a esta superfície, levando a um aumento do crescimento ósseo devido a um incremento dos níveis de fatores de crescimento, e um aumento da ativação das plaquetas que levam a uma super regulação da resposta osteogenica^{12, 13, 15}. Esta superfície parece levar a um aumento do sinergismo dentro da osteocondução segundo GIOVANNA et al²⁰.

A metodologia utilizada no presente estudo está suportada por outros trabalhos, como^{20, 23, 29, 31}, que avaliaram a resposta da interação da microestrutura de diferentes superfícies de implantes e células osteoblásticas quanto à toxicidade, adesão e ancoragem. Estes autores não utilizaram implantes com as mesmas características de superfícies avaliadas neste estudo, mas sim discos planos que foram submetidos aos tratamentos idênticos aos dos implantes. A sugestão para o uso de discos esta diretamente relacionada ao fato que as células não conseguiriam aderir à superfície do implante, por não se tratar de uma superfície plana e pela dificuldade de sua imobilização.

Os métodos utilizados para conferir a superfície dos implantes rugosidade podem não somente alterar a topografia da superfície do titânio, mas também sua composição química e consequentemente a energia de superfície¹⁴. Sendo assim o estudo

das relações entre as características físicas e químicas das superfícies e o comportamento dos osteoblastos contribuirá para o melhor entendimento da ação biológica dos materiais de implantes²⁵. Entretanto, superfícies com alta energia de superfície podem adsorver também anions inorgânicos ou hidrocarbonos orgânicos, contaminantes da atmosfera, em cerca de segundos, resultando em uma alteração da composição química da superfície com conseqüente diminuição da capacidade hidrofílica, assim como os processos de limpeza e esterilização podem aumentar a hidrofobicidade e estas modificações levarem a uma menor taxa de diferenciação dos osteoblastos. Por isso tem-se sugerido¹⁴ que os implantes SLA após receberem o tratamento de jateamento e banhos ácidos, sejam secos sob nitrogênio e estocados em recipientes vedados contendo uma solução de cloreto de sódio (NaCl) e só assim submetidos a esterilização com raio gama afim de minimizar os efeitos nocivos de contato com a atmosfera e aumentar a capacidade hidrofílica da superfície. Células osteoblásticas cultivadas sobre esta superfície hidrofílica e pura quimicamente produziu maiores marcas de diferenciação representadas pelo aumento da camada de células, atividade da fosfatase alcalina e osteocalcina; criando um microambiente osteogênico pelo aumento dos fatores locais como o PGF- β 1 e PGE₂.

Em função da grande quantidade de informações e controvérsias relativas ao tratamento de superfície e sua influência sobre o comportamento celular, são necessários estudos específicos com objetivo de avaliar quantitativamente o desenvolvimento celular frente a novos tipos de superfícies.

A nova metodologia de cultura celular proposta neste estudo propõe examinar a biocompatibilidade celular frente aos materiais de implantes. Uma metodologia de cultura celular tem a vantagem de utilizar populações de células

homogêneas que são geralmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos. Os experimentos podem ser mais bem controlados e fornecer dados quantitativos. Assim este estudo tem como objetivo examinar quanto uma superfície rugosa influencia a adesão e proliferação celular durante os estágios iniciais da interação celular com uma nova superfície de implante.

ARTIGO I**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO QUANTITATIVO DE OSTEÓBLASTOS
SOBRE DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES: UMA NOVA
METODOLOGIA****Authors:****MARIA ANGÉLICA REHDER DE ARAUJO**

DDS, MSc

Pós graduando

Universidade Federal de Santa Catarina

Endereço: Rua Alfredo Ruiz 12-39.

17048-012 Bauru – São Paulo – Brasil

Telefone: (55-14) 32342398

RICARDO DE SOUZA MAGINI

DDS, PhD

Professor Assistente

Departamento de Estomatologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina-Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (UFSC-CEPID).

Centro de Ciências da Saúde – CCS

Campus Universitário Trindade

88040-970 Florianópolis – SC – Brasil

Telefone: (55 – 48) 33319077

DÉCIO DOS SANTOS PINTO JR

DDS, PhD

Professor e chefe do Departamento de Estomatologia da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

CARLOS DOS REIS PEREIRA DE ARAUJO

DDS, PhD

Professor Assistente

Departamento de Prótese. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, SP, Brasil

Endereço: Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, C.P. 73

17012-901 Bauru – São Paulo – Brazil

Telefone: (55-14) 3235 8277

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento quantitativo de linhagens celulares osteoblásticas oriundas da calvária de rato sobre 3 diferentes superfícies de implantes testando uma metodologia inédita de cultura de células diretamente sobre a superfícies dos implantes : Grupo I, implantes usinados, Grupo II, implantes com textura produzida por ataque ácido e Grupo III, implantes especialmente produzidos para este estudo com superfície jateada por partículas seguida de banhos ácidos. Os implantes (n=27) foram imobilizados através de um dispositivo especialmente criado, cultivadas com 1×10^4 células, tripsinizados e submetidos a contagem na câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 h. A análise estatística demonstrou não existirem diferenças entre os tipos de implantes com relação ao número de células e o tempo. Os resultados permitem concluir que a superfície proposta neste estudo, grupo III, apresentou comportamento semelhante ao das outras duas tradicionalmente utilizadas, grupos I e II e sugere sua utilização sem riscos. A metodologia tornou possível a contagem do numero de células aderidas diretamente sobre os implantes com micro e macro topografias, aproximando a situação da realidade clinica.

Unitermos: implantes, cultura celular, osteoblastos, tratamento de superfície.

INTRODUÇÃO

A base para a iniciação da osseointegração é o recrutamento de células específicas e o íntimo contato implante-osso¹⁻⁷. Estas células, mesenquimais indiferenciadas e células preosteoblasticas mudam suas formas e função conforme as características da superfície do implante,⁴⁻¹⁴ demonstrando que a resposta celular inicial após a inserção do implante é crítica para a obtenção da osseointegração. Entretanto a literatura é controversa quanto à superioridade de um tipo de superfície. Mecanismos como os fatores de crescimento ou o fenômeno da apoptose¹⁵ modulam a sobrevivência e proliferação das células sobre as diferentes superfícies de titânio¹⁶. Processos de subtração ou adição têm sido sugeridos a fim de promover porosidades a superfícies dos implantes, através de métodos como a oxidação anódica, ataque ácido, coberturas com hidroxiapatita ou jateamentos. Os poros resultantes do tratamento a superfícies dos implantes acomodarão ou estimularão os osteoblastos a promover a osteogênese de contato. Superfícies usinadas não promovem uma adequada colonização celular à superfície e a produção do novo osso se dará exclusivamente à custa das paredes ósseas da osteotomia.¹⁹ Jateamento de partículas com Al_2O_3 , seguida por banhos ácidos com 1% de ácido fluorídrico/30% de uma solução de ácido nítrico prove uma superfície com adequada biocompatibilidade, com uma taxa de rugosidade de $2,15 \mu\text{m}$ sem apresentar traços de toxicidade^{19, 20, 22,23}. As células aderidas à superfície usinada mostram-se com uma topografia mais plana, enquanto que as superfícies rugosas aparecem com uma topografia irregular e com muitos lamelipódios, que lhes conferem uma maior ancoragem inicial garantindo uma osseointegração mais efetiva.^{4, 10, 12,13}. Ácido clorídrico associado com ácido sulfúrico ou nítrico tem também se mostrado efetivo como agente ácido²². A energia

de superfície e a micro topografia podem influenciar a adsorção de proteínas, a molhabilidade, a adesão e difusão das células sobre os implantes¹⁴. As modificações das superfícies dos implantes alteraram a energia de superfície acarretando na incorporação de íons como Ca conferindo-lhe características bioativas assim como a incorporação de ânions inorgânicos ou hidrocarbonetos oriundos dos processos de limpeza e esterilização aumentando a hidrofobicidade levando a uma diminuição da diferenciação osteoblástica.

A metodologia de cultura celular pode prover experimentos quantitativos mais controlados por utilizar populações de células homogêneas, que geralmente são mais sensíveis à toxicidade. A interação entre os estudos *in vitro* e *in vivo* é essencial para determinar resultados conclusivos^{31, 32}. A maioria dos estudos no passado deixou de simular a situação real do implante, pelo fato de que é muito mais simples cultivar células em placas ou discos planos, imóveis, os quais, no entanto não simulam a geometria verdadeira dos implantes odontológicos. Por essas razões o presente estudo utilizando cultura celular *in vitro* foi projetado para avaliar a extensão da influencia de duas rugosidades superficiais diferentes sobre a adesão e proliferação celular durante estágios iniciais da interação osso-implante em comparação com as tradicionais superfícies usinadas, em um ambiente de superfície real dos implantes.

Hipótese:

Na análise dos grupos, a hipótese de nulidade (a que diz que não tem diferença entre os grupos) mais importante é a da interação do fator (tipo de implante) com as variáveis dependentes (os períodos).

$$H_0: \square 24hUs = \square 24hAc = \square 24hJatAc = \square 48hUs = \square 48hAc = \square 48hJatAc = \square 72hUs \\ = \square 72hAc = \square 72hJatAc$$

E a rejeição da hipótese anterior implica na aceitação da idéia de que há diferença entre as médias verdadeiras de, pelo menos, duas dentre as combinações comparadas.

A análise foi realizada no programa *Statistica 6.0*, *StatSoft*

METODOLOGIA EXPANDIDA

Cultivo Celular

Linhagem Celular e Condições de Cultura:

Foram utilizadas células osteoblásticas de uma linhagem oriunda de calvária de rato (*rattus norvegicus*), que se encontram estocadas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Chemical, C.O., St. Louis, MO, USA).

As células foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 2 minutos e transferidas para placas de Petri de 75 cm², contendo 15 ml de meio de cultivo fresco e mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Após as células aderirem à placa o meio foi trocado, dentro de um período máximo de 24 horas para que os efeitos do DMSO não produzissem quaisquer alterações nas células. O crescimento das células foi monitorado em microscópio de fase invertida e o meio de cultura trocado sempre de acordo com o metabolismo celular. A necessidade de troca do meio de cultura foi feita pelo método visual, com observação da vitalidade celular, coloração e aspecto do mesmo.

Quando em confluência as células foram subcultivadas (Fig 1) de acordo com a necessidade em novas placas. O meio de cultura foi removido, as placas lavadas com PBS, sem cálcio e magnésio, pH 7,2, duas vezes e então separadas com 1 ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1 mM (Sigma) durante aproximadamente cinco minutos. A tripsina se inativa com meio de

cultura fresco, 4 ml de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo NaHCO_3 (1,2 g/L), ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), suplementado com 20% de soro fetal bovino foi adicionado para a inativação da tripsina e então as células em suspensão foram contadas na câmara de hemocítômetro, câmara de Newbaumer, para determinar a concentração de células por microlitros.

Divisão dos Grupos

As amostras foram divididas em três grupos, sendo cada grupo composto por três implantes:

Grupo I: implantes usinados. (Fig 2).

Grupo II: implante com superfície texturizada por ataque ácido. (Fig 3).

Grupo III: implante com superfície texturizada especialmente criada para esta comparação, na qual os implantes foram submetidos inicialmente a jateamento com partículas de óxido de alumínio com 80 μm de diâmetro médio sob pressão controlada de 80 Psi e em seguida submetidos a mesma seqüência de banhos ácidos já utilizados no grupo 2 e cedidos pela NEODENT IMPLANTE OSSEOINTEGRÁVEL(Curitiba – Paraná – Brasil) (Fig 4).

Todos os grupos foram analisados nos tempos 24, 48 e 72 horas. Totalizando 27 implantes.

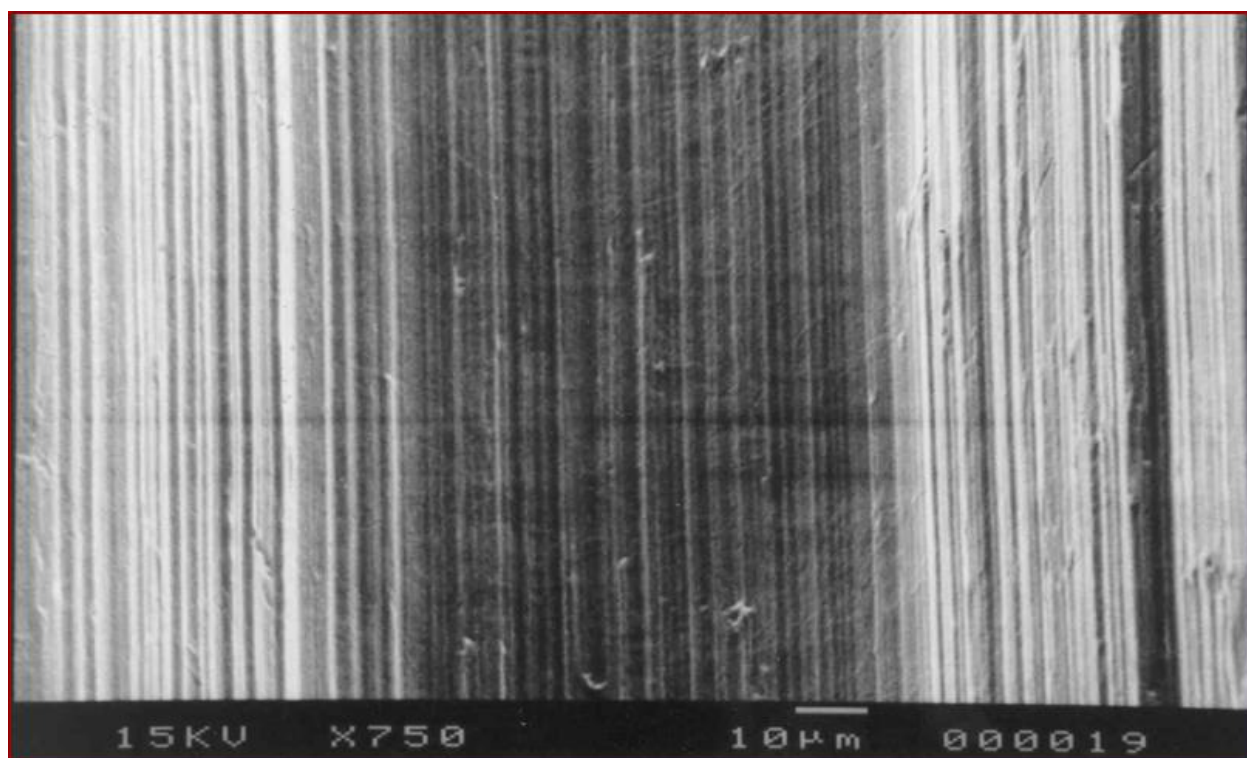


Fig. 1: Imagem da superfície dos implantes Usinados- 750 x MEV. Observe a periodicidade dos sulcos provenientes do processo de usinagem, o crescimento celular sobre esta superfície tende a acompanhar a direção destes sulcos.

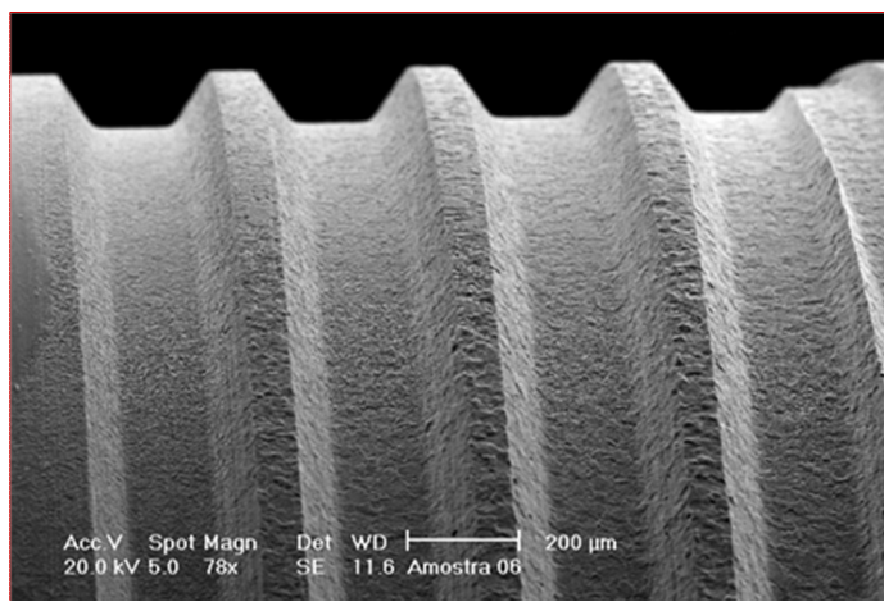
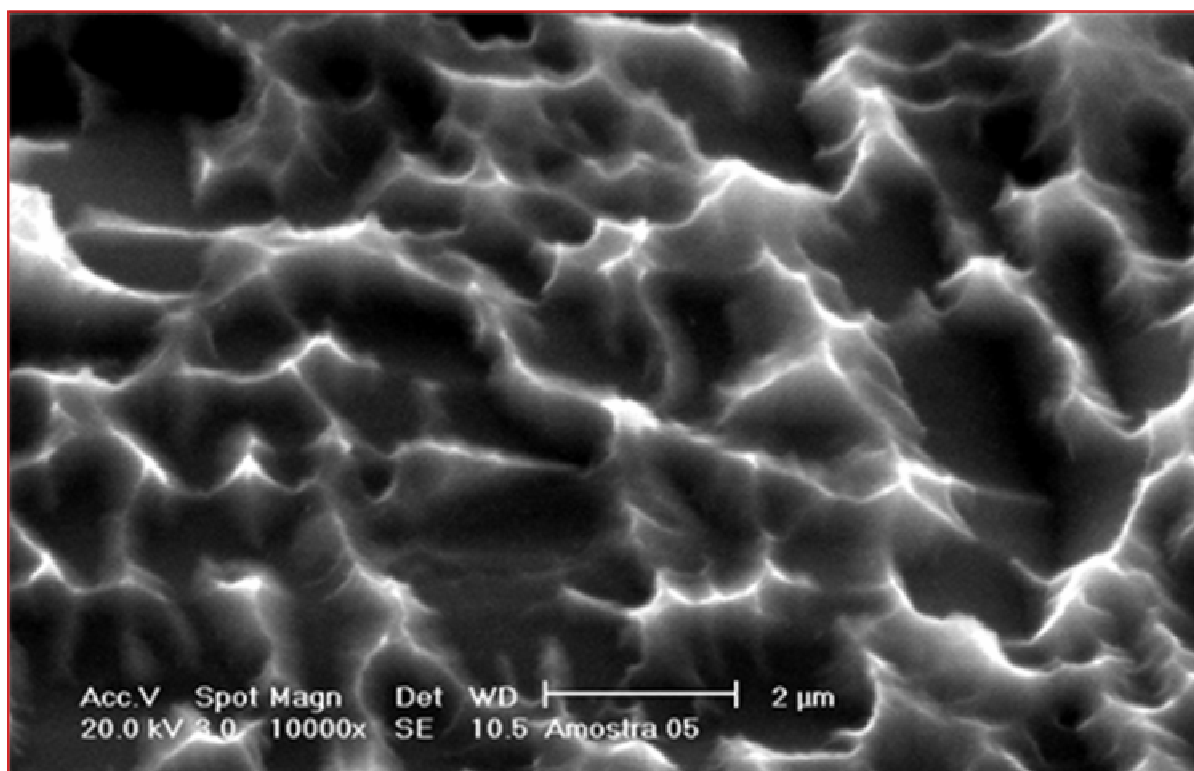


Fig 2: 2 a e 2b Imagem da superfície dos implantes submetidos a sete banhos ácidos – MEV 2000 X e 24 X respectivamente. Observe os flancos pontiagudos uniformemente distribuídos.

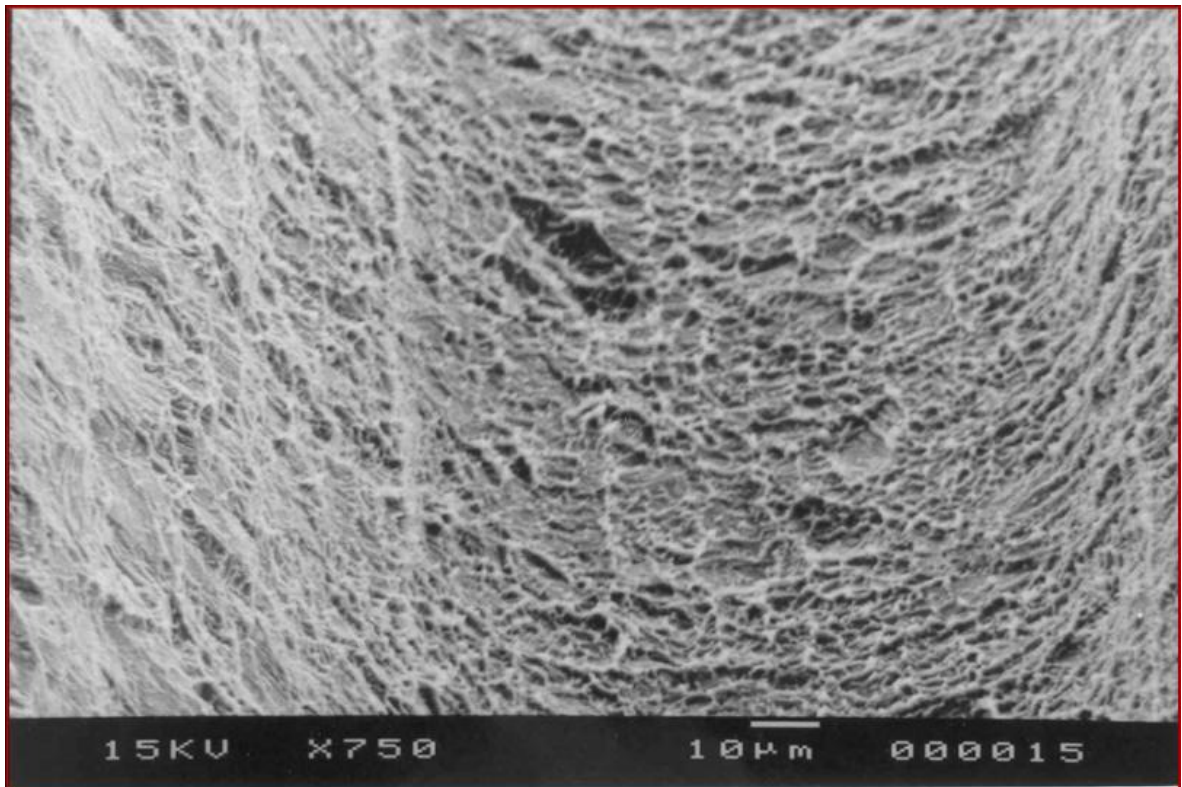


Fig 3: Imagem da superfície dos implantes tratadas por jateamento e banhos ácidos – 750 X MEV. Observe a topografia desta superfície que apresenta mais de um tamanho de porosidade, macro e microporosidades.

Ensaio Para Determinação da Quantidade de Células Por Implante

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura. O crescimento celular foi monitorado diariamente a fim de certificar a não contaminação por todo o período. Após a subconfluência (fig. 1) foram feitas subculturas no intuito de se conseguir um número ideal de células para o plaqueamento dos 27 implantes em placas de 6 poços, foram utilizadas 4 placas. As células foram separadas com 1 ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético 1mM (EDTA- Sigma) durante 5 minutos a 37°C e após este tempo visualizadas no microscópio de luz afim de certificarmos se a maioria das células sofreram o descolamento. A tripsina foi inativada com 4 ml de DMEM. As

placas contendo as células foram tripsinizadas e as células, suspensas e centrifugadas por 5 minutos a 300 RPM. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de PBS e levado a câmara do hemocítmetro e contadas sob microscopia de luz invertida para padronização do número de células plaqueadas (10^4 células) em cada implante.

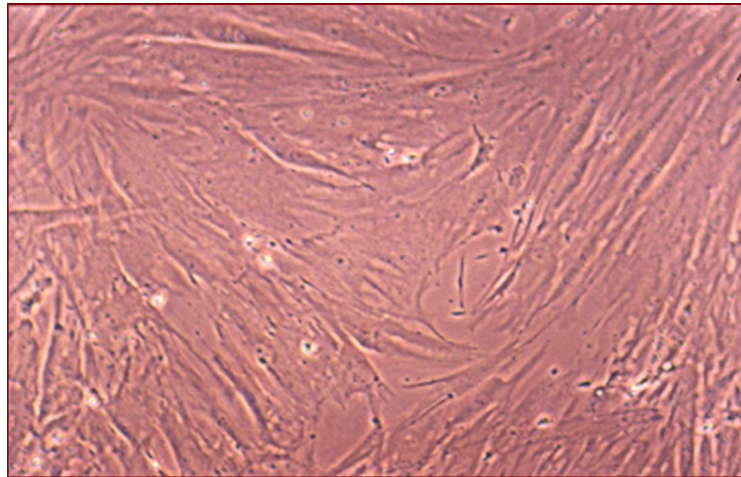


Fig 4: Imagem microscópica das células em sub confluência .

O número total de células presentes nas placas de Petri foi obtido através da seguinte equação matemática:

$$\text{Número total de células} = \frac{\text{Número total de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrados usados para a contagem}}$$

Exemplo: 34

$$\text{Número total de células} = \frac{\text{-----}}{4} = 8,5 \times 1 \times 10^4$$

$$\text{Número total de células} = 8,5 \times 10^4$$

Sabendo-se que em 10ul de suspensão nos temos $8,5 \times 10^4$ células, para semearmos 1×10^4 células necessitaremos de 1,2 ul de suspensão. Assim com o uso de uma regra de três foi calculado o volume de 1,2 microlitros de suspensão para

obtenção de 1×10^4 de células que foi semeado sobre cada implante, dado este extraído da literatura revisada como valor médio ideal para cultura de osteoblastos.

Preparo das Amostras

Foram semeados em média 10000 (1×10^4) osteoblastos por implantes, e após o assentamento dessas células sobre os mesmos, 5 minutos, estes foram mantidos imersos em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo NaHCO_3 (1,2 g/L), ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino, em uma temperatura de 37°C e pressão atmosférica de 5% CO_2 , em placas de 6 poços (fig 5) e foram imobilizados através do uso de um dispositivo(grampos) especialmente desenhados para este fim (fig 6). Os experimentos foram realizados em triplicata.

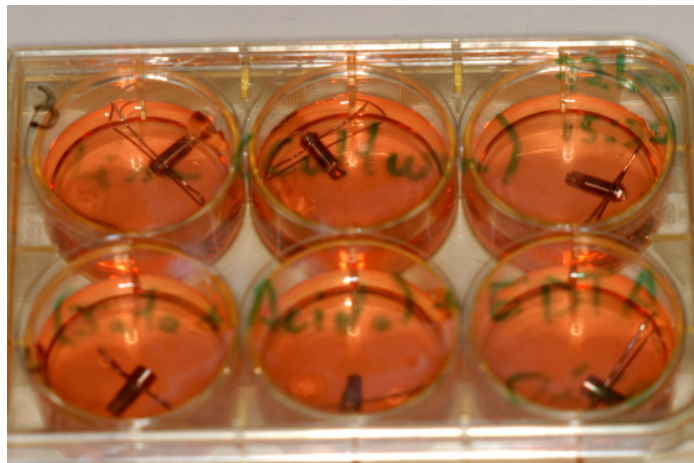


Fig 5: Placa de 6 poços com os implantes submersos em meio DMEM.



Fig 6: Dispositivo de imobilização dos implantes.

Após os períodos de 24, 48 e 72 horas as amostras foram submetidas á análise de contagem na câmera de Newbaumer (fig 7).

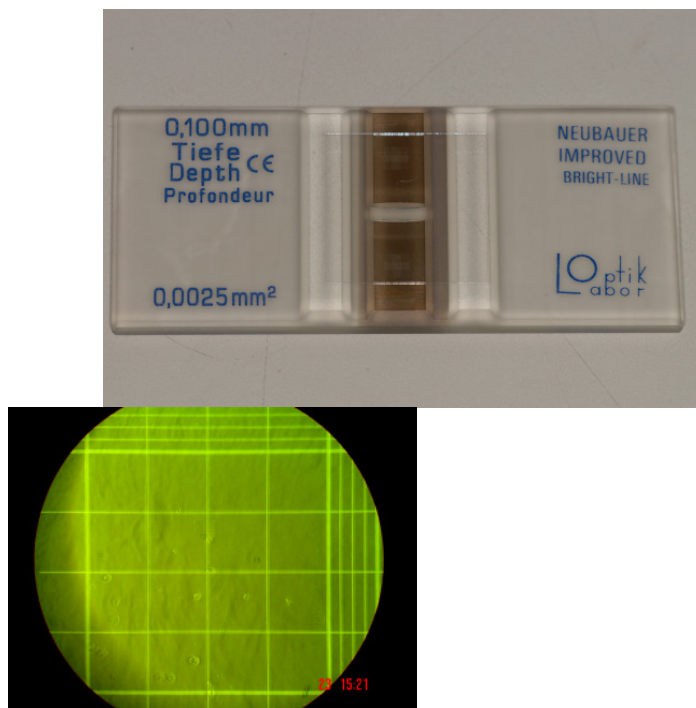


Fig 7: Câmera de Neubaumer – visão de um dos quadrantes(MO) com osteoblastos.

Determinação do Número de Células Viáveis sobre os Implantes Semeados

Protocolo de Tripsinização

Seque abaixo o protocolo utilizado.

- Colocar todo o material na câmara de fluxo lamelar
- Sugar o meio dos poços
- Lavar 2 x com PBS
- Tripsinização
- Colocar tripsina sobre o implante até cobri-lo.
- Deixar 7 minutos na estufa de CO₂ – tempo de descolamento das células.
- Acrescentar à mesma quantidade de meio, para a inativação da tripsina.
- Identificar os tubos
- Centrifugar a 300 RPM por 5 minutos
- Aspirar o sobrenadante
- Colocar 1ml de meio DMEM
- Resuspender
- Levar a câmara do hemocitômetro
- Contagem segundo metodologia apresentada acima.

Análise estatística:

Análise do número de células viáveis de acordo com o tipo de implante e do período.

De acordo com o delineamento da pesquisa e o tipo de variável, foi indicada a Análise de Variância para Medidas Repetidas por se tratar de variáveis paramétricas. A ANOVA para medidas repetidas leva em consideração que as medidas foram feitas nas mesmas amostras nos diferentes períodos, e por isso são vinculadas. A análise de variância apóia a decisão entre aceitar ou rejeitar a hipótese de nulidade deste experimento. Para as comparações múltiplas das médias, foi escolhido o teste Tukey. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Análise dos Grupos

A tabela 1 apresenta descrição da amostra.

Tab. 1: Descrição da amostra .

Tipo de Implante	Período	N	Média	Desvio	Erro	Intervalo de Confiança 95%	
				Padrão	Padrão	Inferior	Superior
Usinado	24	3	1,000000	0,250000	0,144338	0,378966	1,621034
	48		0,916667	0,288675	0,166667	0,199558	1,633775
	72		1,083333	0,144338	0,083333	0,724779	1,441888
Sup Ácida	24	3	0,583333	0,288675	0,166667	-0,133775	1,300442
	48		1,333333	0,577350	0,333333	-0,100884	2,767551
	72		1,500000	0,250000	0,144338	0,878966	2,121034
Sup Jat +ácido	24	3	1,000000	0,661438	0,381881	-0,643103	2,643103
	48		0,833333	0,629153	0,363242	-0,729569	2,396236
	72		1,250000	0,250000	0,144338	0,628966	1,871034
Total	24	9	0,861111	0,435013	0,145004	0,526731	1,195492
	48		1,027778	0,506897	0,168966	0,638142	1,417413
	72		1,277778	0,263523	0,087841	1,075216	1,480340

A partir desta amostra, foi realizada a análise de variância de medidas repetidas para avaliar se existem diferenças entre os tipos de implante, entre os períodos e se a interação Tipo de implante*Períodos é significativa.

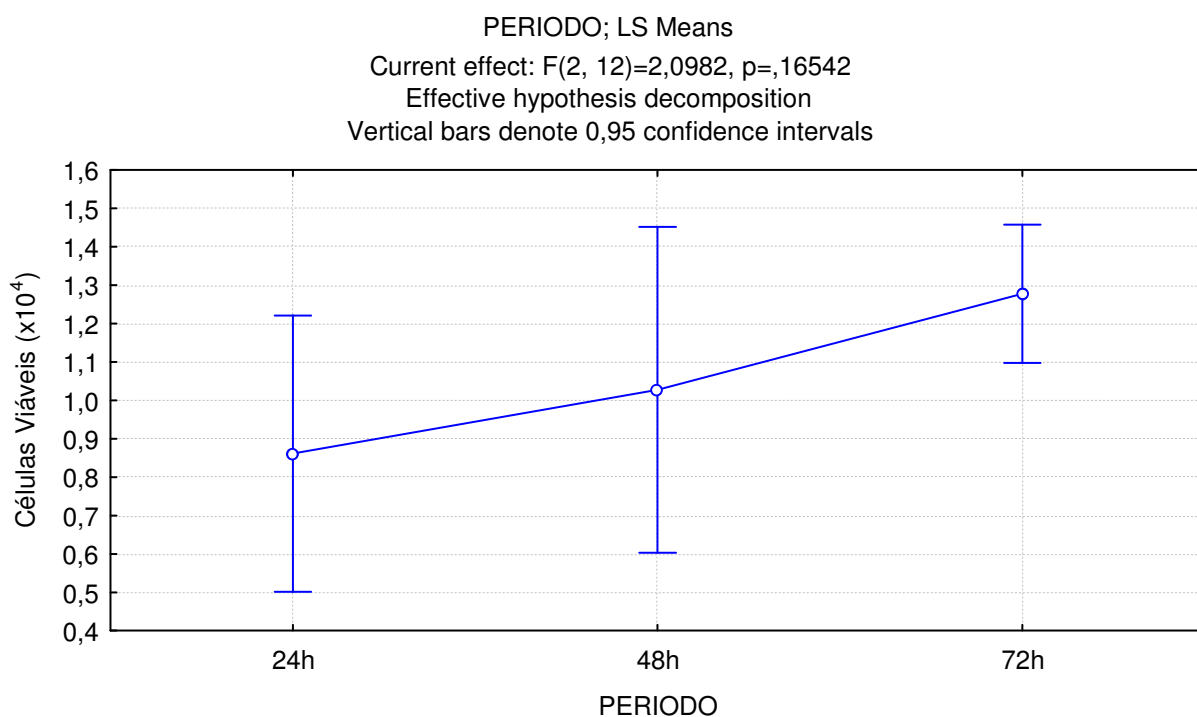
Tab. 2: Análise de Variância com base no desfecho células viáveis.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Valor F	p
Tipo de Implante	0,09722	2	0,04861	0,3559	0,714372
Error	0,81944	6	0,13657		
PERIODO	0,79167	2	0,39583	2,0982	0,165421
PERIODO*Tipo de Implante	0,94444	4	0,23611	1,2515	0,341462
Error	2,26389	12	0,18866		

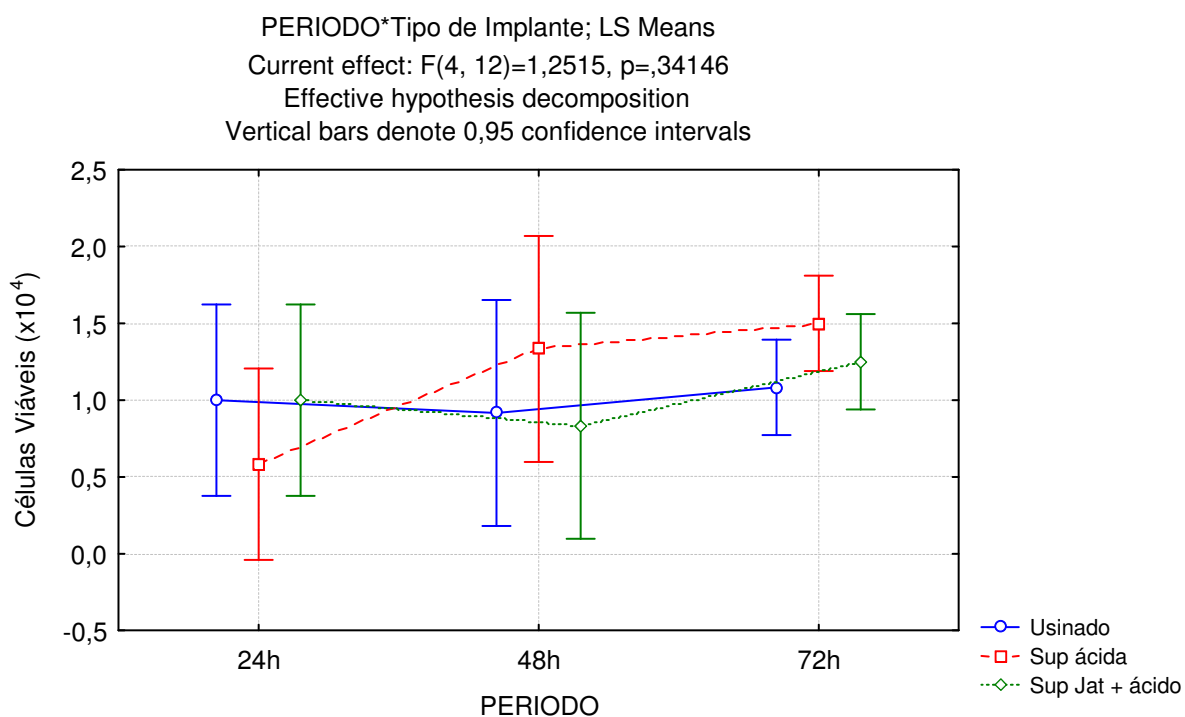
SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrados Médios.

A análise não apresentou significância estatística. Os tipos de implantes não foram diferentes entre si, nem os períodos. A interação também não foi significativa, o que demonstra que uma variável parece não influenciar no comportamento de outra.

Os gráficos abaixo ilustram a análise. As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.



Graf. 1: Médias e intervalo de confiança de células viáveis no período 24 – 72 hs



Graf. 2: Médias e Intervalo de Confiança (95%) de células viáveis na interação Tipo de implante*Tratamento.

Os gráficos abaixo apresentam os valores absolutos do número de células em cada tipo de implante nos tempos 24, 48 e 72 horas:

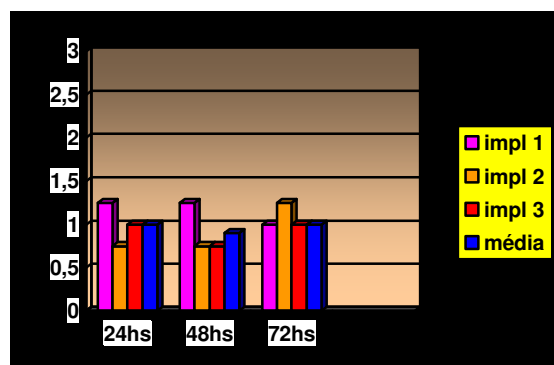


Fig 8: Resultados absolutos expressos $\times 10^4$ dos implantes do grupo 1.

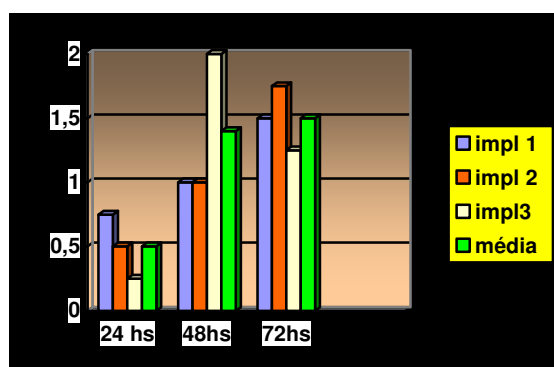


Fig 9: Resultados absolutos expressos $\times 10^4$ dos implantes do grupo2.

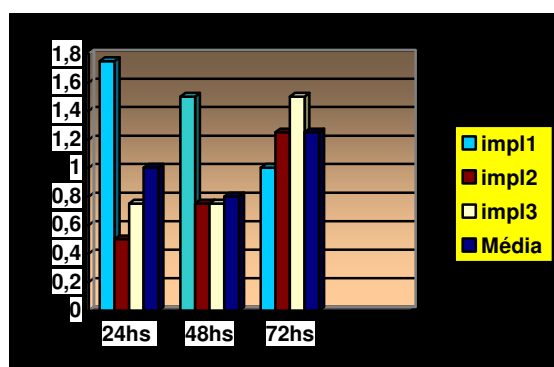


Fig 10: Resultados absolutos expressos $\times 10^4$ dos implantes do grupo3.

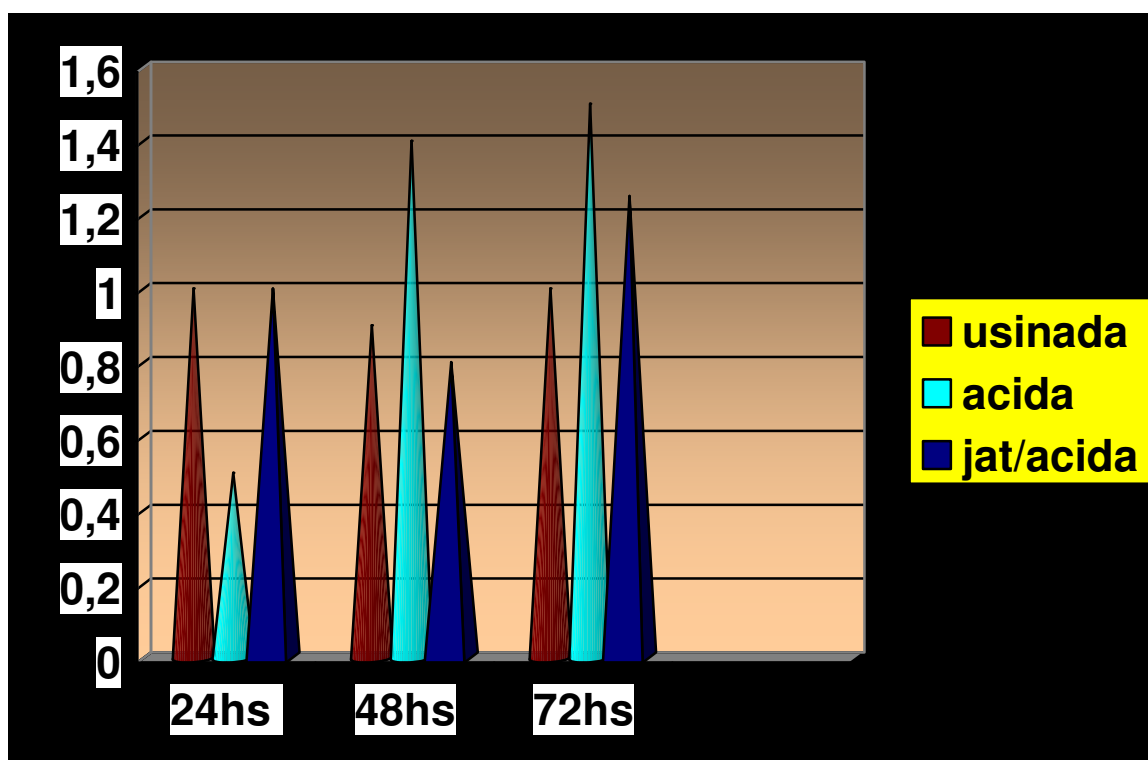


Fig 11: Gráfico comparando os 3 tipos de superfícies com o tempo em relação a quantidade de células(CC) viáveis. Observe que CC na superfície usinada não alterou com o tempo, enquanto as superfícies tratadas ácida e jat/ácida apresentaram CC maior em 72 hs.

DISCUSSÃO

A observação dos resultados obtidos a partir da análise estatística permite verificar que não houve diferenças significativas entre os grupos, quanto ao número de células quando os três grupos foram comparados entre si ou quando o fator tempo foi relacionado tanto na comparação dos grupos entre si, quanto considerando o comportamento celular ao longo do intervalo de tempo avaliado. Isto permite afirmar que a nova superfície, proposta deste estudo, grupo 3 apresenta no mínimo um comportamento equivalente ao das outras superfícies intensamente utilizadas e experimentadas no passado. É importante convir, no entanto, que a força do teste estatístico utilizado pode ser insuficiente para mostrar diferenças reais no comportamento das superfícies estudadas face às dimensões da amostra em questão. Embora sob o ponto de vista estritamente científico verifica-se que não é possível afirmar diferenças entre as superfícies estudadas pode se permitir, considerando-se a literatura pertinente, fazer-se uma análise meramente descritiva a respeito das possíveis diferenças relacionadas com os valores absolutos obtidos a partir do experimento.

Segundo Araujo, et al²⁶, 1 dia após semeadura pode-se caracterizar o fenômeno de adesão celular. Portanto, este comportamento, com relação à superfície que recebeu 2 tipos de tratamento, grupo III, foi comparável ao grupo 1, não mostrando alteração significativa no número de células (CC)- Graf. 2; fig. 11, podendo-se inferir uma taxa de adesão de 100% das células cultivadas, confirmando que este novo tratamento, grupo 3, embora resulte em rugosidade, apresenta uma energia de superfície próxima à do grupo 1, diferente da outra superfície rugosa, grupo II, produzida exclusivamente por ataque ácido, que teve uma taxa de adesão de

apenas 50% das células, provavelmente pela baixa energia superficial que caracteriza este tipo de tratamento. Quanto à proliferação celular, fenômeno que segundo Araujo et al²⁶ caracteriza os eventos do período de 24hs a 72 h após a semeadura. O grupo I e III não apresentaram variações na taxa de proliferação nas primeiras 48hs Fig 8 e 9 e Graf 2. No entanto observou-se um aumento de 50% na taxa de proliferação do grupo III no período 48-72h e um aumento de 40 a 180% na taxa de proliferação do grupo II. O comportamento da superfície do grupo III se mostra semelhante aos implantes do grupo II em 72h de observação. A proliferação celular ocorreu somente sobre as superfícies texturizadas Fig. 9 e 10. O número de células contadas (CC) sobre as superfícies dos implantes estudados, grupo I, II e III nas primeiras 24hs, pode sugerir o número de células aderidas sobre o substrato, de acordo com Araujo²⁶ e Aparicio²⁷. Um número de células (CC) menor sobre a superfície do grupo II pode estar relacionado aos efeitos tóxicos residuais do tratamento ácido utilizado. O tratamento experimental, grupo III, obteve um número de células (CC) maiores no período de 24 h quando comparado ao tratamento do grupo II e é compatível com os resultados de Orsini et al²⁰, que afirmam que este tipo de tratamento é um procedimento seguro e previsível para aumentar a rugosidade dos implantes e melhorar a adesão e proliferação celular.

Muitas hipóteses têm sido sugeridas para explicar como uma superfície com micro irregularidades pode estimular a diferenciação. Uma delas seria de que as células mudam sua forma segundo a morfologia da superfície do implante, chamada de diferenciação funcional das células^{27,29}. Outra hipótese é que a irregularidade tridimensional da superfície forma cavitações que promovem um micro ambiente para a secreção dos fatores de formação óssea. A superfície rugosa

jateada e depois tratada com ácido foi sugerida neste estudo para promover irregularidades ao substrato que se aproximem destas cavitações tridimensionais sugeridas por Chehroudi³⁰.

A adesão celular está diretamente relacionada com a taxa de molhabilidade e a energia de superfície. Superfícies com alta energia são mais adesivas que aquelas com baixa energia de superfície³¹. Sendo assim, no presente estudo o maior número de células encontradas sobre a superfície do grupo 3 pode sugerir em face do comportamento celular frente a esta superfície uma maior taxa de molhabilidade e conseqüentemente uma energia superficial aumentada, achados consoantes com os de Orsini et al²⁰. Assim este resultado pode sugerir que a rugosidade produzida pelo duplo tratamento (grupo 3) estimula a adesão das células através da microtopografia da superfície e a energia de superfície induzindo um contato maior entre a superfície e o ambiente biológico.

A maior taxa absoluta de proliferação foi verificada para a grupo 2 seguida pelo grupo 3 no período 24 a 72hs. Este achado é condizente com a literatura, a qual reporta uma maior taxa de proliferação para os implantes texturizados¹⁵. O controverso resultado sobre proliferação celular entre os estudos de diferentes autores sobre superfícies similares torna difícil correlacionar à qualidade da superfície e a taxa de proliferação, de acordo com Aparicio²⁷. Provavelmente, a proliferação é uma consequência direta da resposta da diferenciação das células porque uma relação recíproca tem sido descrita no desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Embora em função do tamanho da amostra, a estatística não permita o estabelecimento de diferenças concretas, a superfície de implante desenvolvida e testada neste experimento parece apresentar um comportamento que associa as

vantagens iniciais das superfícies usinadas, como uma taxa adequada de adesão e proliferação celular, com o comportamento tardio característico das superfícies rugosas, apresentando uma taxa elevada de diferenciação celular e maturação de osteoblastos, propiciando uma aceleração nos fenômenos da osseointegração principalmente em osso tipo III e IV, com baixa qualidade e áreas enxertadas. Sem dúvida mais estudos com amostras mais numerosas se fazem necessários para confirmar estatisticamente essas suspeitas

CONCLUSÕES:

- 1) Os implantes do grupo I, do grupo II e do grupo III, nas condições do estudo não apresentaram comportamento com relação à adesão e proliferação celular que permita o estabelecerem-se diferenças estatisticamente significantes entre eles.
- 2) Não houve diferenças estatisticamente significante no comportamento das células(CC) sobre os três grupos estudados ao longo de 24,48 e 72h.
- 3) A superfície de implante experimental, grupo 3, criada especialmente para este estudo apresentou comportamento tanto sob o ponto de vista de citotoxicidade e proliferação quanto com relação à evolução do comportamento celular ao longo do intervalo estudado que permite atribuir-lhe comportamento estatisticamente equivalente ao das outras superfícies, grupo 1 e 2 já largamente utilizadas em ambiente clínico, biocompatibilidade e osseointegração.
- 4) Os valores absolutos obtidos na avaliação do comportamento celular demonstram que a superfície testada (grupo 3) apresenta comportamento vantajoso com relação aos implantes do grupo 1 quando se consideram períodos de cultura celular superiores às 48h, embora esta vantagem, nas condições do estudo não possa ser confirmada estatisticamente. Resultado totalmente de acordo com a literatura revisada.

-
- 5) Os valores absolutos obtidos na avaliação do comportamento celular demonstram que a superfície testada, grupo 3 apresenta comportamento vantajoso com correlação aos implantes do grupo 2, quando se consideram períodos de até 24h de cultura celular, embora esta vantagem, nas condições do estudo não possa ser confirmada estatisticamente. Sabendo-se que o número de células (CC) pode refletir a adesão, difusão e proliferação celular e seu aumento é linear com a característica de hidrofiliabilidade, (CC) maior na superfície do grupo 3 pode inferir uma superioridade na capacidade de hidrofilia desta superfície em relação ao grupo 1 e 2, conferindo-lhe um maior contato substrato-célula e possivelmente uma diferenciação e produção de matriz óssea a partir desta superfície, com consequente diminuição do tempo de cicatrização e obtenção da osseointegração principalmente em osso tipo III e IV, com baixa qualidade e áreas enxertadas.
- 6) A metodologia inédita apresentada neste estudo permitiu analisar a contagem do número de células (CC) sobre os implantes comercialmente disponíveis, minimizando os fatores relacionados à confecção de protótipos que poderiam interferir no resultado e sugere que mais estudos devem ser feitos com um maior número de amostras e um maior tempo de observação para a confirmação dos dados e conjecturas propostas.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark P-I. A 15- year study of osseointegrated implants in the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981; 10: 387 – 416.
2. Albrektsson T et al. A multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *J Periodontol* 1988; 59:287-296.
3. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkila PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:163-74.
4. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*. 2003; 82:372-376.
5. Schwartz Z, Martin JY, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res*. 1996 ;30:145-55.
6. Boyan BD et al. Effect of titanium surface roughness on chondrocytes and osteoblasts in vitro-Scan Elect Microsc. *Cell Matter* 1995; 5:323-335.
7. Stanford CM, Keller JC. The concept of osseointegration and bone matrix expression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2:83-101.
8. Swart KM, Keller JC, Wightman JP, Draughn RA, Stanford CM, Michaels CM. Short-term plasma-cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium. *J Oral Implantol*. 1992;18:130-7.
9. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998; 11:391-401.
10. Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;64:499-507.
11. Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988; 3:231-46.

12. Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, et al. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int.* 1999; 64:499-507.
13. Cooper Lf. A role for topography in creating and maintaining bone at endosseous implants. *J Prosthet Dent* 2000; 84:522-534.
14. Zhao G, Schwartz, Wieland M, Rupp F, Geis-Gestorfer J, Cochran DL et al . High surface energy enhances cells response to titanium substrate microstruture. *Wiley InterScience* 2005.DOI: 10.1002/jbm.a30320
15. Postiglione I, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, salzano S, Di Meglio F et al. Behaviour of SaOS-2 cells culture on different titanium surfaces. *J Dent Res* 2003; 82:692-696.
16. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993;14: 126-130.
17. Carinci F; Pezzetti F; Volinia S; Francioso F; Arcelli D; Piatelli A. Analysis of MG63 osteoblastic-cell response to a new nanoporous implant surface by means of a microarray technology. *Clin Oral Impl Res* 2004; 15:180-186.
18. Magini RS, Benfatti CAM, Zendron MV, Ferreira CF, Coura GS, Zortea Jr AJ. Bioingenharía Aplicada a Implantodontia. In: Todescan FF, Bechelli A, Romanelli H(eds). *Implantología Contemporânea: cirurgia y prothesis.* São Paulo: Artes Médicas, 2005.
19. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Jr., et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res.* 1995;29:389-401.
20. Orsini G, assenza B, Scarano A, Piatelli M, Piatelli A. Surface analyses of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15:779-784.
21. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25 and 75 µm-sized particles of AL₂O₃. *J Biomed mater res* 1996;30:251-260.
22. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998;13:611-9.
23. Cooper LF, Masuda T, Whitson W, Yliheikkilä P, Felton DA. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofa Implants* 1999; 14:37-47.

24. Gotfredsen K; Berghundh T; Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: An experimental study in rabbits. *Clin Impl Dent Rel Research* 2000; 2:120-129.
25. Zhang YM, Bataillon-Linez P, Huang P, Zhao M, Han Y, Traisnel M et al. Surface analyses of micro-arc oxidized and hidrothermally treated titanium and effect on osteoblast behavior in Wiley InterScience. 2003 DOI:10.1002/jbm.a.20063.
26. Araujo NS, Jaeger RG, Todescan FF, Jaeger MMM, Groll W. Cell culture test for assessing attachment and proliferation on titanium dental implants with modified surfaces. 2001;8.2.103-109.
27. Aparicio C, Gil FJ, Planell JA. Human-osteoblas proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *J of Mat Science: Mat in Med* 2002; 13:1105-1111
28. Khakbaznejad A, Cherouldi B, Brunette M. Effects of titanium-coated micromachined grooved substrata on orienting layers of osteoblast-like cells and collagen fibers in culture. Wiley InterScience. 2004 DOI:10.1002/jbm.a.30058.
29. Cassinelli C; Morra M; Bruzzone G; Carpi A; Di santi G; Giardino G; Fini M. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surface: 2. In vitro experiments 2003; 18:46-52.
30. Cheroldi B; Mcdonell D; Brunette DM. The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assesseded by radiography and computer image processing. *J Biom Mat Research*1997.
31. Kasten FH, Soleau K, Meffert RM. Quantitative evaliation of Human gingival Epithelial cell attachment to implant surface in vitro. *Int J Period Rest Dent* 1990;10:69-79.